DOI:10.11931/guihaia.gxzw202312052

氮素形态对穿心莲氮吸收、分配和内酯成分积累的影响

简少芬 [1, 2, 3]，林杨 [1, 2, 3]，万斯 [1, 2, 3]，钟楚 [1, 2, 3*]，刘寒 [1, 2, 3]

（1. 广西壮族自治区药用植物园/国家中医药传承创新中心，南宁 530023；2. 广西壮族自治区药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室，南宁 530023；3. 广西壮族自治区药用植物园/广西中药资源智慧创制工程研究中心，南宁 530023）

摘　要：为了明确药用植物穿心莲（*Andrographis paniculata*）对不同氮素形态的利用特征及其与穿心莲内酯成分积累的关系，以硝态氮（NN）、铵态氮（AN）、酰胺态氮（UN）和氨基酸态氮（GN）为单一氮源，采用 ^{15}N 同位素示踪和生理生化分析，研究了氮素形态对穿心莲不同生长时期（快速生长期、拔节期、现蕾期、开花期）氮素吸收、分配和穿心莲内酯成分含量的影响。结果表明：（1）叶片和根中氮含量随生长时期逐渐下降，NN 处理氮含量较低。（2）穿心莲氮吸收速率在营养生长期较高，生殖生长期急速下降，穿心莲对 AN、UN 和 GN 的吸收速率较高。（3）现蕾期叶片氮分配比例减少，茎氮分配比例增加，与 NN 处理相比，该时期 AN、UN 和 GN 处理降低了叶片氮分配比例，而提高了茎和根氮分配比例。（4）快速生长期 NN 处理的光合作用最大羧化速率和最大电子传递速率较低，叶片氮在羧化系统和生物能学组分中的分配比例也较低；UN 和 AN 处理分别在现蕾期和开花期降低了叶片氮在羧化系统中的分配。（5）AN、UN 和 GN 提高了穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量，降低了现蕾期和开花期 14-去氧穿心莲内酯含量，不同氮素形态对新穿心莲内酯的影响较小。（6）穿心莲内酯和新穿心莲内酯含量与叶、茎、根氮含量、氮吸收速率及叶和根中氮分配比例显著负相关，而与茎中氮分配比例显著正相关，14-去氧穿心莲内酯则相反。综上所述，营养生长期是穿心莲氮吸收的主要时期，穿心莲能更好地利用铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮，并通过优化氮分配促进穿心莲内酯成分积累。

关键词：氮素形态，氮素吸收，氮分配，穿心莲内酯，穿心莲

中图分类号：Q945.1　　　　**文献标识码**：A

Effects of nitrogen forms on nitrogen uptake and allocation and andrographolide components accumulation in *Andrographis paniculata*

JIAN Shaofen[1, 2, 3], LIN Yang[1, 2, 3], WAN Si[1, 2, 3], ZHONG Chu[1, 2, 3*], LIU Han[1, 2, 3]

(1. *National Center for TCM Inheritance and Innovation, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants*, Nanning 530023, China; 2. *Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resource Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants*, Nanning 530023, China; 3. *Guangxi Engineering Research Centre of TCM Intelligent Creation*, *Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants*, Nanning 530023, China)

基金项目：国家自然科学基金（82260744）；广西自然科学基金（2020GXNSFBA159025；2022GXNSFBA035542）；广西药用资源保护与遗传改良重点实验室自主课题（KL2020ZZ03, KL2020ZZ05）；广西壮族自治区药用植物园基金（桂药基 202003）；广西药用植物保育人才小高地项目（009699）。

第一作者：简少芬(1984-)，博士，助理研究员，主要从事药用植物营养生物学研究，（E-mail）jsfzc2011@126.com

[*]**通信作者**：钟楚，博士，副研究员，主要从事药用植物栽培技术与理论研究，（E-mail）zhongchu2011@126.com

Abstract: Nitrogen (N) is a mineral nutrient with the highest demand for plants, and it is also a vital abiotic factor that limits plant yield and quality. Plants use inorganic and organic N sources from soil, and N form is a key factor affecting the active ingredients and their contents in medicinal plants. However, the utilization characteristics of different N forms by medicinal plants and the impact on active ingredients remain to be investigated. With nitrate nitrogen (NN), ammonium nitrogen (AN), amide nitrogen (urea, UN) and amino acid nitrogen (glycine, GN) as sole N source and combining ^{15}N isotope tracing and physiological and biochemical analysis, this study aimed to clarify the characteristics of N uptake and utilization and its effect on the accumulation of andrographolide components at different growth stages (rapid growth stage, jointing stage, budding stage, flowering stage) of *Andrographis paniculata*. The results were as follows: (1) N content in leaves and roots decreased gradually with the growth period, and it was lower in the NN treatment. (2) The absorption rate of N was higher in the vegetative growth period, and rapidly decreased in the reproductive growth period. The absorption rate of AN, UN and GN was higher than that of NN in *A. paniculata*. (3) The allocation ratio of N in leaves was decreased, while the allocation ratio of N in stems was increased at budding stage. In comparison to the NN treatment, AN, UN, and GN treatments reduced N allocation ratio in leaves, but increased the ratio in stems and roots at this growth stage. (4) At rapid growth stage, the maximum carboxylation rate and maximum electron transport rate of photosynthesis were lower in the NN treatment, as well as the proportion of leaf N allocation in the carboxylation system and bioenergetics components. However, the allocation of leaf N in the carboxylation system in UN and AN treatment was reduced at budding stage and flowering stage, respectively. (5) AN, UN and GN increased andrographolide and dehydroandrographolide contents, and decreased 14-deoxyandrographolide content at budding and flowering stages, while neoandrographolide was slightly affected by N forms. (6) The contents of andrographolide and neoandrographolide were significantly negatively correlated with N contents in leaves, stems and roots, N uptake rate, and N allocation ratio in leaves and roots, while they were significantly positively correlated with N allocation ratio in stems. The opposite was true for 14-deoxyandrographolide. Taken together, the results indicate that the vegetative growth period is the main period for N uptake in *A. paniculata*, and that *A. paniculata* can better utilize AN, UN, and GN, and promote the accumulation of andrographolide components by optimizing N allocation. The results provide a theoretical reference for N management of *A. paniculata*.
Key words: nitrogen form, nitrogen uptake, nitrogen allocation, andrographolide, *Andrographis paniculata*

氮是植物需求量最大的矿质营养元素，也是限制植物产量和品质的关键非生物因子。植物所需的氮主要来源于土壤，以无机态的硝酸根（NO_3^-）和铵根（NH_4^+）离子为主，也包括一些小分子的氨基酸和多肽等有机态氮（曹小闯等，2015）。不同的氮素形态不仅对植物生长和生理特征有较大影响（Guo et al., 2007），也是影响药用植物次生代谢物积累的关键因子。不同氮素形态对植物次生代谢物积累的影响有很大差别，与次生代谢物种类、植物对氮素形态的偏好性及氮形态的组成有关。如荨麻多酚物质（Biesiada et al., 2009）、甜叶菊的甜菊苷（Sun et al., 2021）、医用大麻的大麻素和萜类物质（Saloner & Bernstein, 2022）等在硝态氮条件下积累较铵态氮条件下高，而在茶树（*Camellia sinensis*）（Yang et al., 2018）、天门冬（梁娟等，2018）、菘蓝（唐晓清等，2017）等植物中，较高比例的铵态氮更有利于次生代谢物质的积累。不同氮素形态可能通过调控药用植物初生代谢（如氨

基酸合成、三羧酸循环和糖酵解）和次生代谢的关系以及次生代谢通路酶编码基因的表达影响次生代谢物的积累（张强等，2018；罗佳琪和付立忠，2020；Chen et al., 2023）。然而，其具体的影响机制还缺乏系统研究。不同氮形态对植物体内活性成分影响的差异在一定程度上与植物对不同形态氮的吸收利用差异有关（晏枫霞等，2010）。但是到目前为止，关于药用植物对不同氮素形态的吸收利用特征及其对次生代谢物积累的影响还鲜有报道。

穿心莲（*Andrographis paniculata*）是我国重要的南药大宗药材之一，在全球草药市场占有重要地位。它起源于南亚的印度和斯里兰卡，广泛应用于南亚、东南亚和东亚传统医药，具有祛热解毒，消炎止痛等功效，是“天然抗生素药物”。笔者前期研究表明，氮素形态影响穿心莲主要活性成分穿心莲内酯的积累，铵态氮和有机态的酰胺态氮和氨基酸态氮相对于硝态氮能提高穿心莲内酯含量（Zhong et al., 2021）。鉴于植物对不同氮素形态的吸收利用普遍存在差异，因此推测不同氮素形态对穿心莲内酯成分积累的影响可能与穿心莲对不同形态氮源的吸收、分配差异有关。本研究以 4 种氮素形态作为唯一氮源，采用无土基质培育穿心莲植株，通过生理生化研究方法和 ^{15}N 稳定同位素示踪技术，拟探讨穿心莲不同生长时期对各氮素形态的吸收利用特征及其与穿心莲内酯成分积累的关系，以期为穿心莲氮素养分的科学管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和处理

以药用植物穿心莲（*Andrographis paniculata*）为材料，原始种子由广西药用植物园种子库提供，由钟楚博士鉴定为爵床科穿心莲属植物穿心莲。经本课题组筛选和纯化后获得性状一致、稳定的株系，用于后续研究。在培养室昼夜恒温（约 28 ℃）条件下，将穿心莲种子放在装有湿滤纸的培养皿中发芽，过程中保持滤纸完全湿润。光照周期为 14 h 光照/10 h 黑暗，200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 的光合有效辐射（photosynthetically active radiation, PAR），相对湿度 60%。大约 10 d 后，将发芽的幼苗移植到装有蛭石、珍珠岩和品氏泥炭土（体积比约为 4∶1∶1）混合基质的育苗盘中继续生长，定期浇水防止幼苗干旱，直到 5 对叶龄。选取健康、长势一致的幼苗移植到装有蛭石和珍珠岩（4∶1）的花盆中进行 N 形态处理。每盆 1 株，移栽前抖净根上附着的基质，每处理 48 盆（株）。将植物置于光温培养室中进行生长，光、温环境同上。

分别以 2 $mmol \cdot L^{-1}$ KNO_3 和 2 $mmol \cdot L^{-1}$ $Ca(NO_3)_2$、6 $mmol \cdot L^{-1}$ NH_4Cl、3 $mmol \cdot L^{-1}$ 尿素 [$CO(NH_2)_2$]和 6 $mmol \cdot L^{-1}$ 甘氨酸提供氮源，分别作为硝态氮（NN）、铵态氮（AN）、酰胺态氮（UN）和氨基酸态氮（GN）处理。营养液中的其他矿物质营养素含有 1 $mmol \cdot L^{-1}$ NaH_2PO_4、2 $mmol \cdot L^{-1}$ KCl、2 $mmol \cdot L^{-1}$ $CaCl_2$、1 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgSO_4$、18 $\mu mol \cdot L^{-1}$ H_3BO_3、0.15 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $ZnSO_4$、0.15 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $CuSO_4$、0.52 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$、9.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ $MnSO_4$ 和 36 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Fe-EDTA。为了维持各处理中 K^+ 和 Ca^{2+} 浓度一致，NN 处理不加 KCl 和 $CaCl_2$，K^+ 和 Ca^{2+} 由 KNO_3 和 $Ca(NO_3)_2$ 提供。将溶液的 pH 值调至 5.8~6.0，并在营养液中加入 10 $mg \cdot L^{-1}$ 氨苄青霉素以抑制微生物繁殖。每周浇营养液 2 次，每盆 100 mL。每处理长势一致的植株有 40 株左右，可满足取样的需求。处理 30、50、70、85 d 后取样分析。

1.2 测定方法

1.2.1 光合作用 CO_2 响应曲线

分别在移栽后 30 d（快速生长期）、50 d（拔节期）、70 d（现蕾期）和 85 d（开花期）选取长势一致的植株 3 株，采用 LI-6400XT 便携式光合测定系统，测定主茎上第 9 至 12 叶位（不同时期叶位不同，但同一时期各处理叶位相同）叶片光合作用 CO_2 响应特征。使用内置 LED 光源，红蓝光比例为 9:1，PAR 为 1 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$，叶室温度 25 ℃，相对湿度 60%~70%，$CO_2$ 浓度梯度为 50、100、150、200、300、400、600、800、1 000、1 200、

1 500 μmol·mol^{-1}。

将叶片置于叶室中，在 1 500 μmol·m^{-2}·s^{-1} PAR、400 μmol·mol^{-1} CO_2浓度下适应至少 20 min，待各参数稳定后，开始测量各 CO_2浓度下的光合气体交换参数。根据 FvCB 模型（Farquhar et al., 1980）对 CO_2响应曲线进行拟合，计算最大羧化速率($V_{c\,max}$)和最大电子传递速率(J_{max})。

1.2.2 叶绿素含量、比叶重和比叶氮测定

测定完光合作用之后，用直径 6 mm 的打孔器在叶片中部主脉两侧各取 4 片叶圆片置于 10 ml 离心管中，加入 5 mL 丙酮∶乙醇（1∶1，体积比）混合液，在室温暗处浸提 24 h，直至叶片完全变白。测定浸提溶液在 663 nm 和 645 nm 处的吸光值，计算叶绿素 a、b 和总叶绿素含量（张宪政，1986）。

另用打孔器在叶片两侧各取 5 片叶圆片，70 ℃烘干至恒重，称重后，叶片用 H_2SO_4-H_2O_2在 260 ℃消煮，靛酚蓝比色法测定总氮含量（吕伟仙等，2004）。比叶重（specific leaf weight，SLM）和比叶氮（specific leaf nitrogen，SLN）分别为单位叶片面积的重量和氮含量。

1.2.3 ^{15}N同位素标记和测定

分别在快速生长期、拔节期、现蕾期和开花期各处理选取长势一致的植株 4 株，取样前 6 d，将营养液中的氮源分别换成 ^{15}N标记的相应氮源，^{15}N原子丰度均为 10%。每 3 d 处理 1 次，处理结束后，将植株根系完整取出，用自来水冲洗干净附着的蛭石和珍珠岩，1 mmol·L^{-1} $CaCl_2$冲洗 1 min，然后去离子水冲洗干净。把植株根、茎、叶各部位分开，分别装入牛皮纸袋后 105 ℃杀青 30 min，75 ℃烘干至恒重，称重后将各部位研磨成细粉。采用连续流动同位素比值质谱仪偶联碳氮元素分析仪（ANCA-MS，PDZ-Eropa）测定各部位 ^{15}N原子丰度，并计算 ^{15}N含量和吸收速率。

1. 2.4 植株生物量和总氮含量测定

生物量和植株总氮含量采用 1.2.3 样品进行测定。总氮含量采用靛酚蓝比色法测定（吕伟仙等，2004）。

1.2.5 穿心莲内酯成分含量

叶片干样中穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、14-去氧穿心莲内酯和新穿心莲内酯含量的测定参考王雨霞等（2022）的方法，采用 1.2.3 样品进行测定。

1.3 数据处理与统计

光合氮分配：将光合机构分为羧化系统（PN_C）、生物能学（PN_B）和集光系统（PN_L）3 部分（史作民等，2015）。各部分氮的分配比例按下式计算：

$$PN_{\mathrm{C}} = \frac{V_{\mathrm{c\,max}}}{6.25 \times V_{\mathrm{cr}} \times N_{\mathrm{area}}} \qquad (1)$$

$$PN_{\mathrm{B}} = \frac{J_{\mathrm{max}}}{8.06 \times J_{\mathrm{mc}} \times N_{\mathrm{area}}} \qquad (2)$$

$$PN_{\mathrm{L}} = \frac{C_{\mathrm{c}}}{C_{\mathrm{B}} \times N_{\mathrm{area}}} \qquad (3)$$

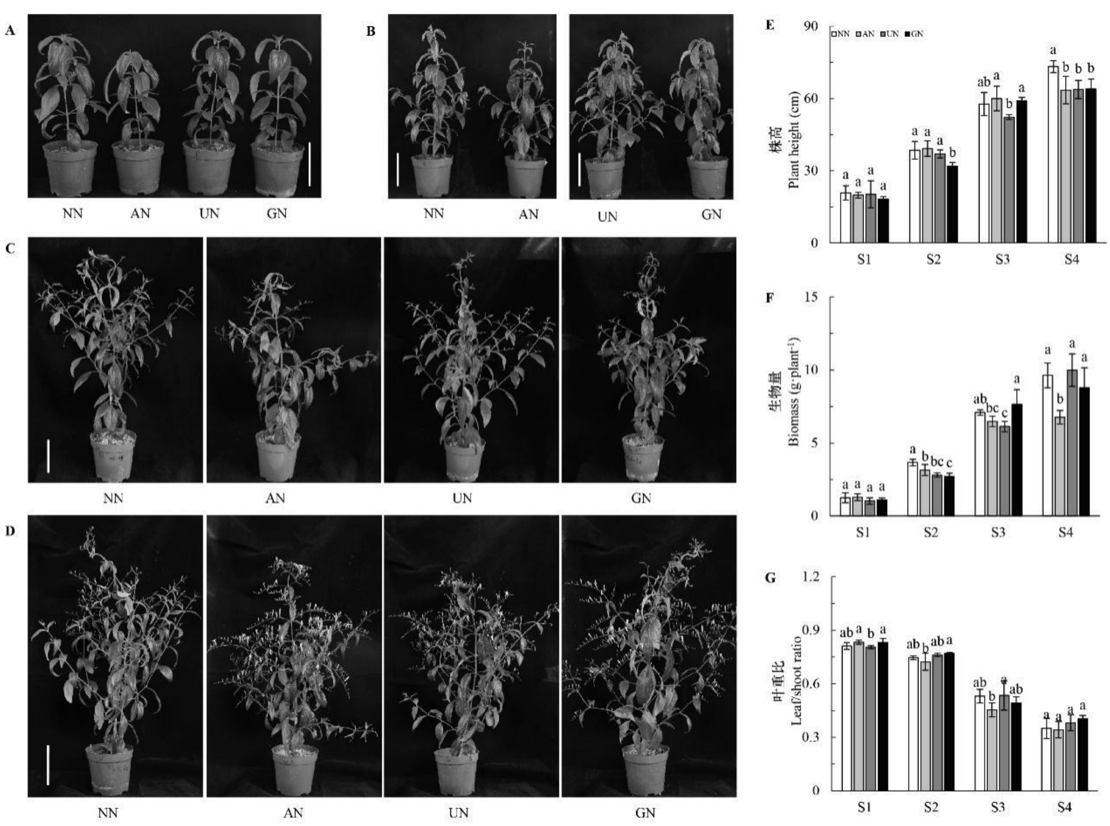
式中：$V_{c\,max}$为最大羧化速率（μmol·m^{-2}·s^{-1}）；J_{max}为最大电子传递速率（μmol·m^{-2}·s^{-1}），由 CO_2响应曲线根据 FvCB 模型拟合得到；C_C为叶绿素含量（mmol·m^{-2}）；N_{area}为单位叶片面积氮含量（SLN，g·m^{-2}）；V_{cr}为 Rubisco 比活，取值为 20.78 μmol CO_2·g^{-1} Rubisco·s^{-1}；J_{mc}为单位 Cyt *f* 的最大电子传递速率，取值 156 μmol e$^-$·μmol^{-1} cyt *f*·s^{-1}；C_B为捕光系统中叶绿素与氮的比值，取值 2.15 mmol·g^{-1} N（史作民等，2015）。

采用单因素方差分析和 *LSD* 法多重比较处理间差异显著性。数据以平均值±标准差（n=3 或 4）表示，数据统计分析在 SPSS 19.0 数据处理系统中进行，以 Microsoft Excel 2023 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同氮源对穿心莲生长的影响

如图 1 所示，用不同氮源处理 5 对叶龄穿心莲植株 30 d（图 1：A，S1）、50 d（图 1：B，S2）、70 d（图 1：C，S3）和 85 d（图 1：D，S4）的表型没有太大差别，硝态氮（NN）处理的植株进入开花期稍晚。各处理前 3 个时期株高差异较小，而在开花期 NN 处理株高显著高于其他 3 个处理（图 1：E）。各处理植株生物量在 S1 时期没有显著差异，而在 S2 时期，NN 处理显著高于其他 3 个处理，S3 时期 AN 和 UN 的生物量较低，而 S4 时期以 AN 的生物量最低，显著低于其他 3 个处理（图 1：F）。叶片生物量占地上部生物量的比例随生长时期而逐渐下降，S1 时期以 UN 处理最低，而 S2 和 S3 时期以 AN 处理最低，S4 时期各处理没有显著差异（图 1：G）。



图中标尺长度为 10 cm。同一时期不同处理间柱子上不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。

Scale bars are 10 cm. Different letters on the bars at the same stage indicate significant differences between treatments at $P < 0.05$ level. The same as below.

图 1 不同氮源对穿心莲生长动态的影响

Fig. 1 Effects of different N sources on dynamic growth of *Andrographis paniculata*

2.2 氮源对穿心莲氮吸收、积累和分配的影响

各处理植株叶片氮含量随生长时期呈逐渐下降的变化。NN 处理各时期叶片氮含量相对较低，在 S1 和 S3 时期显著低于其他 3 个处理（图 2：A）。茎中氮含量在整个生育期变化不大，S1 时期 NN 和 AN 相对较低，与 UN 差异显著；S2 时期 AN 最低，与 NN 和 GN 差异显著；S3 时期 AN 最低，与 UN 差异显著；S4 时期各处理差异不显著（图 2：B）。根中氮含量随生长时期而下降，UN 处理在各时期均最高，除 S2 时期，NN 处理在其他 3 个时期均最低。NN 和 AN 处理在 S1、S2 和 S4 时期显著低于 UN 和 GN（S4 时期 AN 除外），而在 S3 时期 NN 和 GN 显著低于 AN 和 UN（图 2：C）。植株总氮含量随生长时期

呈逐渐下降变化，NN 处理在各时期普遍较低（图 2：D）。

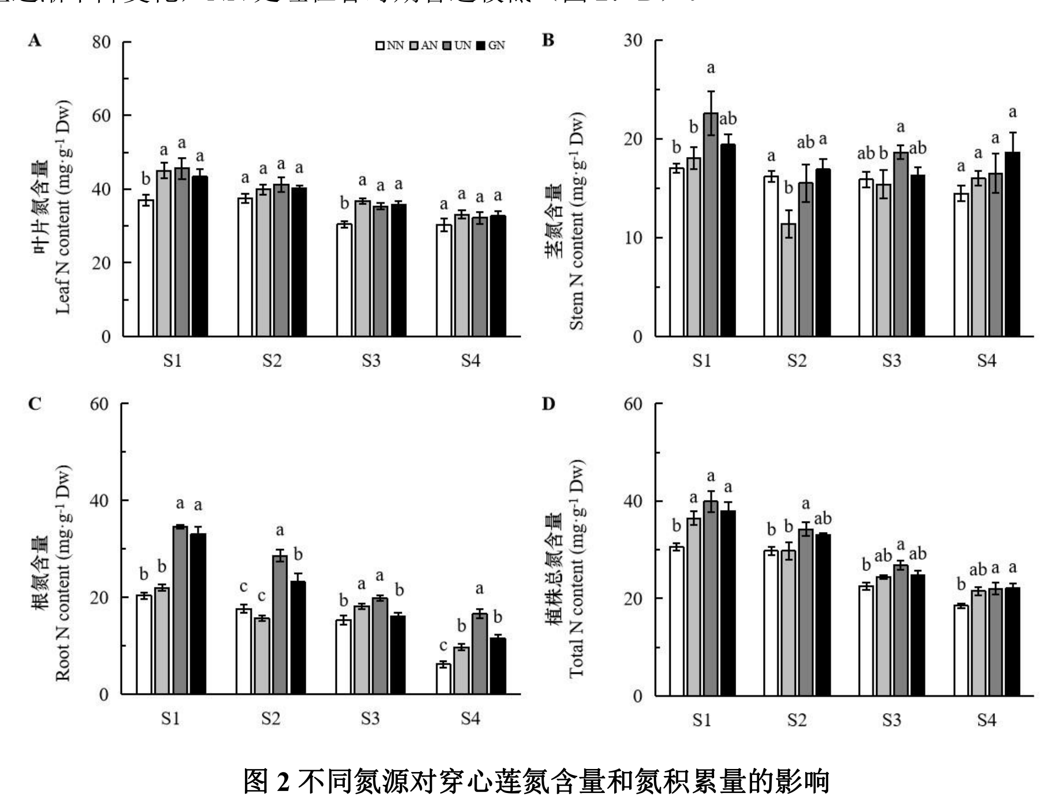


图 2 不同氮源对穿心莲氮含量和氮积累量的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen forms on N contents and accumulation in *Andrographis paniculata*

以 ^{15}N 稳定同位素进行示踪，测定了不同氮源处理下穿心莲的氮吸收速率。如图 3：A 所示，在前 2 个生长时期穿心莲对氮的吸收速率较高，随后急剧下降。各生长时期穿心莲对硝态氮的吸收速率始终最低，S1~S3 时期显著低于 AN 处理，而 S3 和 S4 时期显著低于 UN 处理，S1 和 S4 时期还显著低于 GN 处理。结果说明，穿心莲可以更好地利用铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮。

通过计算 ^{15}N 在各器官中的分配比例，结果表明，S1 和 S2 时期各氮源处理穿心莲吸收的 ^{15}N 主要分布在叶片中，而 S3 和 S4 时期在茎中的分配比例大幅增加，甚至高于叶片中分配的比例（图 3：B）。S1 时期 AN 处理与 NN 处理的 ^{15}N 分配较为相似，而 UN 与 GN 处理相似。NN 和 AN 处理穿心莲叶片中 ^{15}N 的分配比例明显高于 UN 和 GN 处理，而根中 ^{15}N 的分配比例则明显低于 UN 和 GN 处理。S2 时期 NN 和 AN 各器官 ^{15}N 的分配比例没有太大变化，而 UN 和 GN 处理根中 ^{15}N 的分配比例明显下降，而叶片和茎中 ^{15}N 的分配比例有所增加。S3 时期 AN、UN 和 GN 处理叶片中 ^{15}N 的分配比例明显较 NN 处理低，而根中分配比例则明显较高。S4 时期各处理各器官中 ^{15}N 的分配比例没有明显差异。

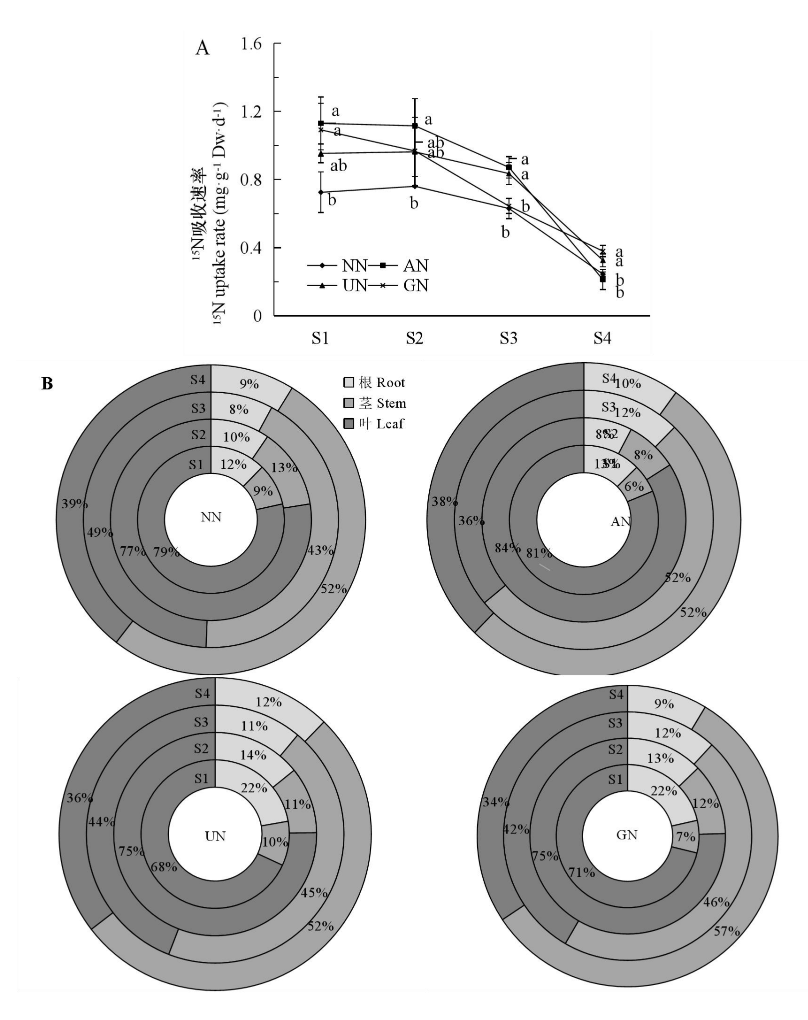


图 3 不同氮源对穿心莲 ^{15}N 吸收速率和分配的影响

Fig.3 Effects of nitrogen forms on ^{15}N uptake rate and allocation in *Andrographis paniculata*

2.3 氮源对穿心莲光合氮分配的影响

不同氮源处理对不同生长时期穿心莲光合作用 CO_2 响应特征有明显影响。AN、UN 和 GN 处理在 S1 时期 $V_{c\,max}$ 和 J_{max} 均显著高于 NN 处理。S2 时期 AN 处理 $V_{c\,max}$ 和 J_{max} 最高，显著高于 UN 和 NN 处理。S3 时期 AN 处理的 $V_{c\,max}$ 和 J_{max} 仍显著高于其他 3 个处理，而 S4 时期各处理之间没有显著差异。各处理叶绿素含量在生长前期较低，后期较高， S1 和 S4 时期处理间差异不显著。S2 时期 GN 处理叶绿素含量最高，显著高于 NN 和 UN 处理。S3 时期 AN 处理叶绿素含量显著高于其他处理。各处理比叶氮（SLN）在 S1 和 S2 时期相对较低，而 S3 和 S4 时期相对较高。S1 时期 AN 和 UN 处理显著高于 GN 处理，S3 和 S4 时期 AN 处理最高。

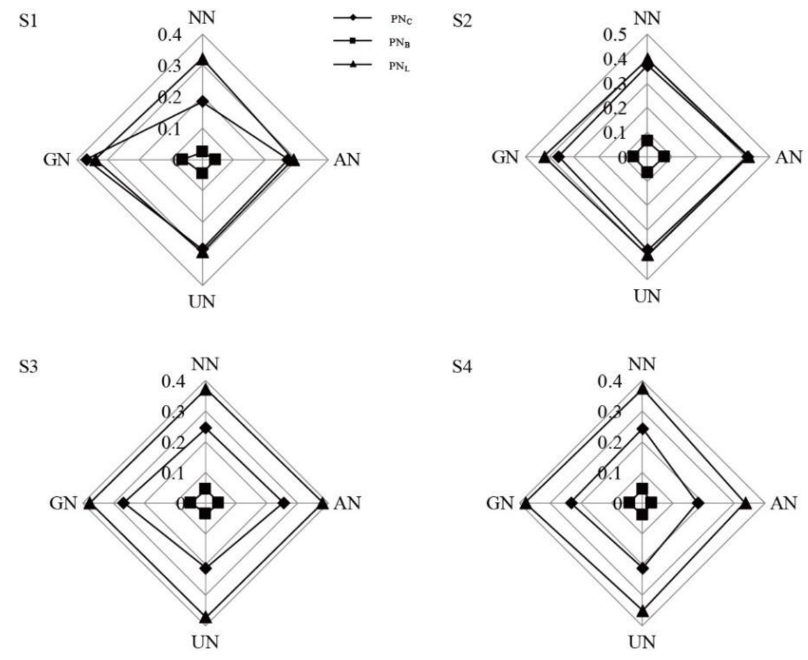
表 1 不同氮源对穿心莲光合 CO_2 响应曲线参数的影响（*n*=3）

Table1 Effects of N sources on the parameters of photosynthetic CO_2 response curve in *Andrographis paniculata* (*n*=3)

时期 Growth stage	处理 Treatment	$V_{c\,max}$ (μmol·m^{-1}·s^{-1})	J_{max} (μmol·m^{-1}·s^{-1})	叶绿素含量 Chlorophyll content (mmol·m^{-2})	比叶氮 SLN (g·m^{-2})
S1	NN	26.02±1.29b	20.48±1.89b	0.43±0.02a	0.70±0.06ab
	AN	41.90±1.59a	40.62±4.09a	0.42±0.01a	0.75±0.04a
	UN	43.88±0.91a	41.44±2.51a	0.42±0.01a	0.75±0.02a
	GN	44.53±0.41a	44.10±3.22a	0.38±0.01a	0.59±0.08b
S2	NN	50.52±1.98b	53.21±0.98bc	0.50±0.02b	0.66±0.05a
	AN	57.90±1.25a	58.72±1.40a	0.55±0.01ab	0.69±0.01a

	UN	49.80±0.56b	50.11±0.91c	0.49±0.03b	0.64±0.05a
	GN	55.48±1.34a	55.05±1.17ab	0.60±0.01a	0.75±0.08a
S3	NN	42.64±1.41b	45.98±2.08b	0.61±0.03b	0.86±0.07b
	AN	55.50±2.49a	57.50±2.12a	0.78±0.01a	1.07±0.07a
	UN	33.68±1.56c	36.19±1.11c	0.56±0.03b	0.78±0.07b
	GN	42.72±0.75b	46.10±0.97b	0.56±0.05b	0.76±0.01b
S4	NN	40.93±0.49a	45.39±0.67a	0.59±0.02a	0.83±0.04b
	AN	38.83±0.46a	40.00±0.16b	0.67±0.01a	1.05±0.06a
	UN	39.36±1.87a	44.55±2.31a	0.60±0.04a	0.90±0.05ab
	GN	39.55±0.54a	44.67±1.29a	0.61±0.06a	0.85±0.10ab

图 4 为叶片氮在光合机构中的分配情况。分配于光合机构中的叶片氮比例为 52.8%~88.7%，随生长时期呈先升高后降低的趋势，S2 时期比例最高，与该时期有较高的 $V_{c\,max}$ 和 J_{max} 一致。叶片氮在光合机构 3 个组分中分配的比例以生物能学最低，不到 10%。S1 和 S2 时期各处理叶片氮在集光系统和羧化系统中分配的比例相当，但 S1 时期 NN 处理羧化系统中氮的分配比例较其他处理低。S3 和 S4 时期各处理叶片氮主要分配于集光系统中，处理间相差不大。S3 时期 UN 处理和 S4 时期 AN 处理中羧化系统氮分配比例明显低于同时期其他处理。



PN_C. 羧化系统中氮分配比例；**PN_B**. 生物能学组分中氮分配比例；**PN_L**. 集光系统中氮分配比例。

PN_C. N allocation ratio in carboxylation system; **PN_B**. N allocation ratio in bioenergy; **PN_L**. N allocation ratio in light-harvesting system.

图 4 不同氮源对穿心莲光合氮分配的影响

Fig.4 Effects of nitrogen forms on photosynthetic N allocation in *Andrographis paniculata*

2.4 氮形态对穿心莲内酯成分积累的影响

如图 5：A 所示，AN 处理穿心莲内酯含量在各时期均较高，其中 S1 和 S2 时期显著高于其他 3 个处理，而其他 3 个处理差异不显著。尤其是 S2 时期，AN 处理的穿心莲内酯含量是其他处理的 4 倍以上。S3 时期 UN 和 GN 处理的穿心莲内酯含量迅速上升，其中 UN 与 AN 差异不显著，GN 处理显著低于 AN 和 UN，但都显著高于 NN。该时期 AN 和 UN 处理的穿心莲内酯含量是 NN 处理的 3 倍左右。S4 时期 UN 处理的穿心莲内酯含量仍维持较高水平，显著高于其他处理，而 GN 处理的穿心莲内酯含量下降，与 NN 差异不显著，二者显著低于 AN 处理。

各处理新穿心莲内酯含量随生长时期逐渐升高，S1 时期以 GN 最高，显著高于其他处

理。S2 时期 UN 最低，显著低于 NN 处理。S3 时期各处理没有显著差异，而 S4 时期 UN 处理最高，显著高于其他 3 个处理（图 5：B）。14-去氧穿心莲内酯含量随生长时期逐渐下降，NN 处理各时期相对较高，尤其在 S3 和 S4 时期显著高于其他 3 个处理（图 5：C）。各时期 NN 处理的脱水穿心莲内酯含量都较低，在 S1 和 S3 时期未检出。AN 处理各时期脱水穿心莲内酯含量都最高，显著高于其他 3 个处理。UN 和 GN 处理的脱水穿心莲内酯含量在前 2 个时期较低，而后 2 个时期相对较高（图 5：D）。AN 处理总内酯含量在 S1 和 S2 时期显著高于其他 3 个处理，而其他 3 个处理之间没有显著差异。S3 时期 AN 与 UN 和 GN 差异不显著，三者显著高于 NN 处理。S4 时期以 UN 处理最高，其次为 AN，NN 和 GN 处理最低（图 5：E）。总体来看，铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮有利于提高穿心莲内酯及总内酯含量。

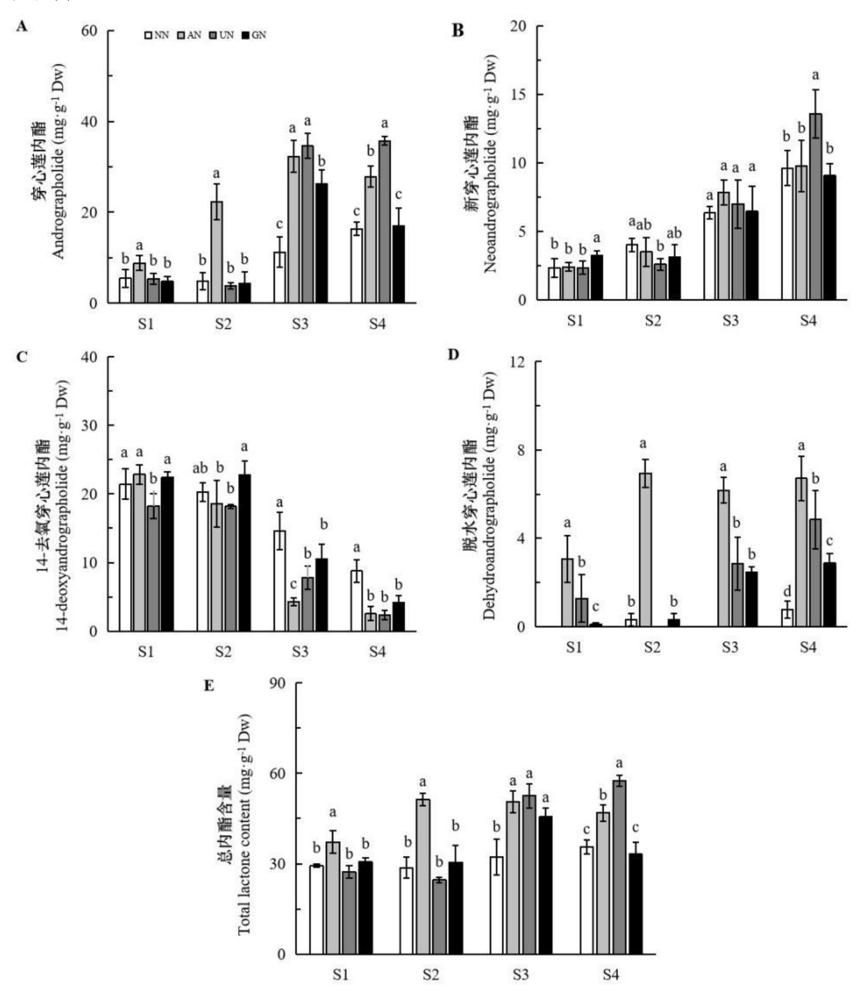


图 5 不同氮源对穿心莲内酯成分含量的影响

Fig.5 Effects of nitrogen source on the components of andrographolide compounds

2.5 穿心莲内酯成分含量与氮吸收和分配的相关性分析

相关性分析结果表明（表 2），穿心莲内酯和新穿心莲内酯含量与根、茎、叶氮含量以及叶片和根中氮分配比例、氮吸收速率负相关，而与茎中氮分配比例极显著正相关。14-去氧穿心莲内酯含量与穿心莲内酯含量和新穿心莲内酯含量极显著负相关，因此其与叶和根中氮含量及氮分配比例、氮吸收速率显著或极显著正相关，而与茎中氮分配比例极显著负相关。总内酯含量与穿心莲内酯含量相似，与茎和根中氮含量及叶中氮分配比例极显著负相关，与茎中氮分配比例极显著正相关。结果说明，降低植株氮含量，增加氮在茎中的分配比例可以有效提高穿心莲内酯及总内酯含量。

各器官氮含量之间相互呈极显著正相关，而茎中氮分配比例与叶和根中氮分配比例均呈极显著负相关，尤其与叶中氮分配比例的相关性最强。叶和根中较高的氮含量也会提高氮在它们当中的分配比例，而不利于茎中氮分配比例的增加。

表 2 穿心莲二萜内酯成分含量与氮含量和氮分配比例的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between the contents of diterpene lactones and nitrogen content and nitrogen allocation ratio

指 标 Index	LNC	SNC	RNC	LNR	SNR	RNR	NUR	AD	NAD	DOAD	TL
LNC	1	0.395**	0.692**	0.682**	-0.740**	0.480**	0.764**	-0.446**	-0.695**	0.623**	-0.282
SNC		1	0.566**	-0.040	-0.074	0.526**	0.087	-0.373**	-0.244	0.167	-0.450**
RNC			1	0.505**	-0.651**	0.842**	0.523**	-0.508**	-0.629**	0.591**	-0.415**
LNR				1	-0.978**	0.200	0.772**	-0.654**	-0.861**	0.898**	-0.394**
SNR					1	-0.399**	-0.785**	0.668**	0.873**	-0.911**	0.411**
RNR						1	0.298*	-0.265	-0.319*	0.333*	-0.198
NUR							1	-0.339*	-0.746**	0.670**	-0.146
AD								1	0.761**	-0.799**	0.934**
NAD									1	-0.894**	0.610**
DOAD										1	-0.561**
TL											1

注：**LNC**. 叶片氮含量；**SNC**. 茎氮含量；**RNC**. 根氮含量；**LNR**. 叶片氮分配比例；**SNR**. 茎中氮分配比例；**RNR**. 根中氮分配比例；**NUR**. 氮吸收速率；**AD**. 穿心莲内酯；**NAD**. 新穿心莲内酯；**DOAD**. 14-去氧穿心莲内酯；**TL**. 总内酯。因部分样本中脱水穿心莲内酯未检出，该指标不进行分析。*表示差异显著（$P<0.05$）；**表示差异极显著（$P<0.01$）。

Note: **LNC**. Leaf N content; **SNC**. Stem N content; **RNC**. Root N content; **LNR**. Leaf N allocation ratio; **SNR**. Stem N allocation ratio; **RNR**. Root N allocation ratio; **NUR**. Nitrogen uptake rate; **AD**. Andrographolide; **NAD**. Neoandrographolide; **DOAD**. 14-deoxyandrographolide; **TL**. Total lectones. Dehydroandrographolide is not analyzed due to its undetectable in some samples. * indicates significant differences（$P<0.05$）; ** indicates extremely significant differences（$P<0.01$）.

3 讨论与结论

3.1 穿心莲对不同氮源的吸收和利用特征

植物可以直接利用无机态氮和有机态氮，但对不同氮素形态的吸收利用存在较大差异，大部分陆地植物以吸收硝态氮为主，只有少数植物如水稻、茶树、马铃薯（郝凯等，2020）等以利用铵态氮为主。本研究中通过 ^{15}N 示踪发现，穿心莲对铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮的吸收速率要明显高于对硝态氮的吸收速率，尤其对铵态氮的吸收速率最高，表现出对铵态氮有一定的偏好性。同时也发现，铵态氮及酰胺态氮、氨基酸态氮处理穿心莲叶片在现蕾期以前均有较高的氮含量。以上结果说明，穿心莲能更好地利用这 3 种氮形态。值得注意的是，铵态氮处理植株虽然生物量相对较小，但并未出现如叶片黄化、植株生长受抑制，甚至致死等典型的铵毒症状（Jian et al., 2018; Hachiya et al., 2021）。铵抑制穿心莲生物量积累的原因仍有待进一步研究。

利用 ^{15}N 同位素示踪比较不同生长时期氮素吸收速率的变化可知，拔节期（S2）之前是穿心莲氮素吸收的主要时期，进入现蕾期（S3）之后氮素吸收速率开始大幅下降。结果表明，拔节期之前的营养生长期是穿心莲氮需求的关键时期，而进入生殖生长后对氮素的需求急剧减少。^{15}N 同位素示踪结果还表明，现蕾期是植株水平上氮素重新分配的关键时期。因氮吸收减少，叶片中氮分配比例下降，植株将氮转移至茎和根，尤以铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮处理的植株该时期叶片中的氮向根和茎中转运更加明显。此外，这 3 种氮源处理的植株根中氮含量也普遍较硝态氮处理高，与 ^{15}N 测定结果一致。综上，穿心莲生产上氮肥应主要在营养生长期施用，生殖生长期因氮吸收速率下降，植株体内氮以重新

分配为主，应避免在生殖生长期施用氮肥。

3.2 氮源对穿心莲内酯成分的影响

本研究表明，不同氮素形态对穿心莲内酯成分有较大影响。氮素形态对药用植物不同活性成分的影响差异已有广泛报道，但关于其机理还缺乏深入研究。根据碳/养分平衡假说，较高的氮含量通常导致药用植物富含碳的次生代谢物质积累下降（罗佳琪和付立忠，2020）。本研究中穿心莲内酯、新穿心莲内酯和总内酯含量与叶、茎、根中的氮含量及氮吸收速率负相关。然而，铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮处理下植株叶片氮含量和氮吸收速率较硝态氮处理植株高且穿心莲内酯含量也相对较高。相关性分析结果反映了各生长时期氮含量变化与穿心莲内酯成分变化有关，而不同氮素形态处理之间叶片氮含量和氮吸收速率的差异不是造成内酯含量差异的主要原因。

光合产物是植物次生代谢的最初物质来源，维持较高的光合能力可以为次生代谢提供更多的同化物。铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮处理的植株具有较强的光合能力，可能是导致穿心莲内酯含量较高的原因之一。植物叶片中大部分的氮都存在于光合器官中参与光合作用（Makino et al., 2003）。因此，叶片氮含量及其在光合机构各组分中的分配对光合作用有重要影响（史作民等，2015）。营养生长期是植物干物质积累的重要时期。该研究中，铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮处理的穿心莲叶片始终具有相对较高的氮含量，而且在营养生长时期（S1 和 S2）具有较高的光合能力以及较高的 V_{cmax} 和 J_{max}，表明这 3 种氮源处理的植株将更多的氮投入到光合作用中，光合作用受到的化学限制也较小。从氮在光合机构组分中的分配可以看出，S1 时期硝态氮处理的植株光合氮在羧化系统和生物能学组分中分配的比例较其他处理低，可能是导致其光合能力较低的重要原因。

植物由营养生长向生殖生长的转化期是氮素转移的关键时期，也是穿心莲内酯成分积累的重要时期（陈娟等，2014）。本研究中现蕾期（S3）穿心莲内酯和新穿心莲内酯含量开始大量积累。该时期铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮处理叶片氮的分配比例较硝态氮处理明显下降，而根和茎中的氮分配比例增加。相关性分析也表明，穿心莲内酯和新穿心莲内酯含量与叶片氮分配比例显著负相关而与茎中氮分配比例显著正相关，说明该时期叶片氮向茎中转移增加对穿心莲内酯积累有促进作用。叶片是氮同化的主要器官，尤其生长后期大量氮积累将增加碳水化合物消耗而不利于次生代谢物质积累（Zhong et al., 2021）。该研究结果在一定程度上符合碳/养分平衡假说的预测。氮在光合机构各组分中的分配也影响植物对氮的再利用（刘涛，2018）。水溶性蛋白较其他类型蛋白更易被降解而再利用。羧化系统中的氮主要以羧化酶为主，占水溶性蛋白的一半以上（Carmo-Silva et al., 2015）。羧化系统中维持较高的氮比例不仅降低植物光合效率（Mu et al., 2016），也降低叶片中氮的转移和再利用。生长后期（S3 和 S4）铵态氮和酰胺态氮处理植株羧化系统氮的比例下降，可能有利于叶片中氮的转移。

综合以上分析，铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮影响穿心莲植株和叶片氮分配，提高穿心莲营养生长期光合能力，促进生殖生长期植株叶片氮素向茎中的转移，为叶片中穿心莲内酯成分的合成与积累提供了物质基础。

3.3 本研究的潜在意义

氮素形态通过调控药用植物次生代谢物合成通路中酶基因的表达而影响活性成分积累（张强等，2018）。穿心莲内酯属于半日花烷型二萜内酯，其合成通路还尚未被解析。该研究中发现，14-去氧穿心莲内酯含量与穿心莲内酯含量极显著负相关，铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮不仅提高穿心莲内酯含量，还特异性地提高了脱水穿心莲内酯含量，尤以铵态氮的效果更加明显。结果说明，穿心莲内酯含量的提高与 14-去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量的变化有密切联系。该研究结果支持了任俊泽（2023）最近提出的穿心莲内酯合成的推测路径，即由 14-去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯通过单加氧反应形成穿心

莲内酯。细胞色素氧化酶 P450（CYP450）家族蛋白酶催化单加氧反应，在药用植物化学成分的修饰方面起到重要作用（Xu et al., 2015）。可以推测，铵态氮、酰胺态氮和氨基酸态氮可能诱导了某个（或某几个）*CYP*450 基因的上调表达，促进了 14-去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯向穿心莲内酯的转化。长期以来，虽然有较多关于穿心莲 *CYP450* 基因的研究（Garg et al., 2015；Liang et al., 2020；孙铭阳等，2022），但催化穿心莲内酯合成的关键 *CYP*450 基因还未见报道。该研究为穿心莲内酯合成通路中 *CYP*450 基因的挖掘奠定了基础。

参考文献：

BIESIADA A, WOŁOSZCZAK E, SOKÓŁŁETOWSKA A, et al., 2009. The effect of nitrogen form and dose on yield, chemical composition and antioxidant activity of stinging nettle (*Urtica dioica* L.)[J]. Herba Pol, 55(3): 84-91.

CAO X, WU L, MA Q, et al., 2015. Advances in studies of absorption and utilization of amino acids by plants: A review [J]. Chin J Appl Ecol, 26(3): 919-929. [曹小闯，吴良欢，马庆旭，等，2015. 高等植物对氨基酸态氮的吸收与利用研究进展[J]. 应用生态学报，26(3)：919-929.]

CARMO-SILVA E, SCALES JC, MADGWICK PJ, et al., 2015. Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource use efficiency[J]. Plant Cell Environ, 38: 1817-1832.

CHEN J, GU W, DUAN J, et al., 2014. Study on active components of *Andrographis paniculata* at various growth periods and differential expression of key enzyme gene[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 45(21): 3149-3152. [陈娟，谷巍，段金廒，等，2014. 不同生长期穿心莲活性成分及关键酶基因差异表达研究[J]. 中草药，45(21)：3149-3152.]

CHEN Y, BAI Y, ZHANG Z, et al., 2023. Transcriptomics and metabolomics reveal the primary and secondary metabolism changes in *Glycyrrhiza uralensis* with different forms of nitrogen utilization[J]. Front Plant Sci, 14: 1229253.

FARQUHAR GD, VON CAEMMERER S, BERRY JA, 1980. A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C3 species[J]. Planta, 149: 78-90.

GARG A, AGRAWAL L, MISRA RC, et al., 2015. *Andrographis paniculata* transcriptome provides molecular insights into tissue-specific accumulation of medicinal diterpenes[J]. BMC Genomics, 16(1): 659.

GUO SW, ZHOU Y, GAO YX, et al., 2007. New insights into the nitrogen form effect on photosynthesis and photorespiration[J]. Pedosphere, 17(5): 601-610.

HACHIYA T, INABA J, WAKAZAKI M, et al., 2021. Excessive ammonium assimilation by plastidic glutamine synthetase causes ammonium toxicity in *Arabidopsis thaliana*[J]. Nat Commun, 12: 4944.

HAO K, JIA L, QIN Y, et al., 2020. Research progress about nitrogen effects on potato source-sink relationship[J]. Crops, 36(3): 22-26. [郝凯，贾立国，秦永林，等，2020. 氮素对马铃薯源-库关系影响研究进展[J]. 作物杂志，36(3)：22-26.]

JIAN S, LIAO Q, SONG H, et al., 2018. NRT1.1-related NH_4^+ toxicity is associated with a disturbed balance between NH_4^+ uptake and assimilation [J]. Plant Physiol, 178: 1473-1488.

LIANG J, YE Y, YANG W, 2018. Effects of different nitrogen form ratios on growth and quality of *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr [J]. Soil Fert Sci China, (1): 28-31. [梁娟，叶漪，杨伟，2018. 不同氮素形态及配比对天门冬生长和品质的影响[J]. 中国土壤与肥料，(1)：28-31.]

LIANG Y, CHEN S, WEI K, et al., 2020. Chromosome level genome assembly of *Andrographis paniculata* [J]. Front Genet, 11: 701.

LIU T, 2018. Mechanisms underlying the effects of nitrogen supply on leaf nitrogen-forms partitioning and photosynthetic nitrogen use efficiency of *Brassica napus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University [刘涛，2018. 氮供应对油菜叶片氮形态分配与光合氮利用效率的影响机理[D]. 武汉：华中农业大学.]

LUO J, FU L, 2020. Research progress on the effect of nitrogen on the accumulation of active ingredients in medicinal plants [J]. J Zhejiang Agric Sci, 61(6):1046-1049. [罗佳琪，付立忠，2020. 氮素对药用植物有效成分累积的影响研究进展[J]. 浙江农业科学，61(6)：1046-1049.]

LV W, GE Y, WU J, et al., 2004. Study on the method for the determination of nitric nitrogen, ammoniacal nitrogen and total nitrogen in plant [J]. Spectrosc Spectr Anal, 24(2): 204-206. [吕伟仙，葛滢，吴建之，等，2004. 植物中硝态氮、氨态氮、总氮测定方法的比较研究[J]. 光谱学与光谱分析，24(2)：204-206.]

MAKINO A, SAKUMA H, SUDO E, et al., 2003. Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation[J]. Plant Cell Physiol, 44(9): 952-956.

MU XH, CHEN QW, CHEN FJ, et al., 2016. Within-leaf nitrogen allocation in adaptation to low nitrogen supply in maize during grain-filling stage [J]. Front Plant Sci, 7: 699-709.

REN J, 2023. Biosynthetic pathway elucidation and microbial cell factory construction of active diterpenoids of *Andrographis panucilata* [D]. Shanghai: Naval Medical University. [任俊泽，2023. 穿心莲活性二萜的生物合成途径解析及微生物细胞工厂构建[D]. 上海：中国人民解放军海军军医大学.]

SALONER A, BERNSTEIN N, 2022. Nitrogen source matters: high NH_4^+/NO_3^- ratio reduces cannabinoids, terpenoids, and yield in medical cannabis[J]. Front Plant Sci, 13: 830224.

SHI Z, TANG J, CHENG R, et al., 2015. A review of nitrogen allocation in leaves and factors in its effects[J]. Acta Ecol Sin, 35(18): 5909-5919. [史作民，唐敬超，程瑞梅，等，2015. 植物叶片氮分配及其影响因子研究进展[J]. 生态学报，35(18)：5909-5919.]

SUN M, XU S, LI J, et al., 2020. Transcriptome analysis and discovery of genes related to andrographolide synthesis of *Andrographis paniculata* under UV-C treatment [J]. J S Agric, 53(3): 618-627. [孙铭阳，徐世强，李静宇，等，2020. UV-C 处理穿心莲转录组分析及穿心莲内酯合成相关基因挖掘 [J]. 南方农业学报，53(3)：618-627.]

SUN Y, ZHANG T, XU X, et al., 2021. Transcriptomic characterization of nitrate-enhanced stevioside glycoside synthesis in stevia (*Stevia rebaudiana*) Bertoni[J]. Int J Mol Sci, 22: 8549.

SUN W, LENG L, YIN QG, et al., 2019. The medicinal plant *Andrographis paniculata* genome provides insight into biosynthesis of the bioactive diterpenoid neoandrographolide [J]. Plant J, 97(5): 841-857.

TANG X, YANG Y, LV T, et al., 2017. Effects of nitrogen form and ratio on growth and active component content in summer-planted *Isatis indigotica* [J]. J Plant Resour Environ, 26(1): 21-29. [唐晓清，杨月，吕婷婷，等，2017. 氮素形态及配比对夏播菘蓝生长及活性成分含量的影响[J]. 植物资源与环境学报，26(1)：21-29.]

WANG Y, ZOU X, LI C, et al., 2023. Investigation of yield traits and medicinal components of Andrographis paniculata germplasm [J]. Acta Sci Nat Univ Sunyat, 62(3): 100-108. [王雨霞，邹秀崑，李春雨，等，2023. 穿心莲种质产量性状与药用成分分析[J]. 中山大学学报（自然科学版），62(3)：100-108.]

XU J, WANG X, GUO W, 2015. The cytochrome P450 superfamily: Key players in plant development and defense [J]. J Integr Agric, 14(9): 1673-1686.

YAN F, WANG K, TANG X, et al., 2010. Effects of NH_4^+-N/NO_3^--N ratio on the active component and mineral elements contents of *Isatis indigotica* Fort. [J]. Jiangsu J Agric Sci, 26(4): 735-739. [晏枫霞，王康才，唐晓清，等，2010. 氮素形态对菘蓝活性成分和矿质元素含量的影响[J]. 江苏农业学报，26(4)：735-739.]

YANG Y, WANG F, WAN Q, et al, 2018. Transcriptome analysis using RNA-Seq revealed the effects of nitrogen form on major secondary metabolite biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*) plants[J]. Acta Physiol Plant, 40: 127.

ZHANG Q, LIU Y, WU X, et al., 2018. Preliminary study on the effects of two different nitrogen forms on flavonoids accumulation and related molecular mechanism in medicinal plant *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. Bull Bot Res, 38(3): 367-376. [张强，刘一，吴晓敏，等，2018. 两种氮素形态对药用植物三叶青中黄酮类活性成分积累的影响及相关分子机制的初步探讨[J]. 植物研究，38(3)：367-376.]

ZHANG X, 1986. Determination of chlorophyll content in plants—Acetone ethanol mixture method [J]. Liaoning Agric Sci, (3): 26-28. [张宪政，1986. 植物叶绿素含量测定——丙酮乙醇混合液法[J]. 辽宁农业科学，(3)：26-28.]

ZHONG C, JIAN SF, CHEN DL, et al., 2021. Organic nitrogen sources promote andrographolide biosynthesis by reducing nitrogen metabolism and increasing carbon accumulation in *Andrographis paniculata* [J]. Plant Physiol Biochem, 164: 82-91.